Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Entwicklung eines Mikrotestsystems zur quantitativen Bestimmung der Lymphozytenproliferation

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
GEORG FUCHS
aus Stuttgart

1984

BIBLIOTECA CENTRAL

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536515_0004

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Entwicklung eines Mikrotestsystems zur quantitativen Bestimmung der Lymphozytenproliferation

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
GEORG FUCHS
aus Stuttgart

1984

Dekan: Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. E. Heidemann
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Malchow

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Regulatoren der Lymphozytenproliferation	1
1.2. Bestimmung des Proliferationsverhaltens von Lymphozyten	2
2. Material und Methoden	3
2.1. Theoretische Grundlagen der Lymphozytenstimulation durch Phytohämagglutinin	3
2.2. Versuchsdurchführung	6
3. Ergebnisse	10
4. Diskussion	20
5. Zusammenfassung	31
6. Abbildungen	32
7. Literaturverzeichnis	39
8. Lebenslauf	44

Abkürzungen:

DNA	Desoxyribonucleinsäure
PHA	Phytohämagglutinin
^{3}H-TdR	^{3}H-Thymidin
^{3}H-UdR	^{3}H-Uridin
RNA	Ribonucleinsäure
DEM	Dulbecco's Modified Medium
Con A	Concanavalin A
PWM	pokeweed-mitogen
FCS	fetal calf serum
ICP	Impuls-Cyto-Photometrie
RNase	Ribonuclease

1. Einleitung

Seit der ersten Beschreibung pluripotenter Stammzellen der Hämatopoese galt großes Interesse der Erforschung der Differenzierung und der Proliferation dieser Zellen. Sowohl für die Erythropoese, Megakaryopoese, Granulopoese, als auch für die Lymphopoese wurden eine Reihe humoraler Regulationsfaktoren, Stimulatoren und Inhibitoren beschrieben (HEIDEMANN, 1980a, 1980b).

1.1. Regulatoren der Lymphozytenproliferation

Neben zahlreichen Hinweisen, daß die Lymphozytenproliferation einem endogenen Regelkreis folgt, war besonders das Verständnis der Regulation der Immunreaktion und der Mechanismus der Lymphozytenproliferation von Interesse. Für die Neoplasien des lymphatischen Systems (HAUSEN et. al. 1969, LORD et. al. 1977) war ein verändertes Ansprechen auf Wachstumsregulatoren oder eine veränderte Bildungsrate derselben angenommen worden (TIBBETTS et. al. 1975).

Als Stimulatoren der Lymphopoese wurden unter anderem beschrieben: Makrophagenfaktor, evt. identisch mit Lymphozytenaktivierendem Faktor (LAF), T-Zellinduzierende Aktivität (TCI), Lymphozytosestimulierender Faktor (LSF), B-Lymphozytose-Faktor und das aus Thymus isolierte Thymosin.
Außerdem beginnen Lymphozyten, sich auf einen Mitogenstimulus hin (Phytohämagglutinin, Pokeweed-Mitogen, Concanavalin A, Dextransulfat, Agarmitogen) blastenförmig zu transformieren und zu teilen. Daneben wurde auch eine Reihe von Inhibitoren der Lymphopoese untersucht, so das Prostaglandin E, das von BULLOUGH propagierte Lymphozytenchalon, das Alpha-Fetoprotein, das immunregulatorische Alpha-Globulin, der aus Thymus extra-

hierte LIFT (lymphocyte inhibiting factor extracted from thymus) und das auch als Virostaticum wirkende Interferon.

1.2. Bestimmung des Proliferationsverhaltens von Lymphozyten

Die Rolle, die oben genannte Regulationsfaktoren für die Proliferation von Lymphozyten spielen, wurde bisher vorwiegend durch Einbaumessungen radioaktiv markierter Nukleotide und Aminosäuren gemessen. Dabei wurden die durch Impulszählraten gemessenen Aktivitäten als quantitatives Maß für die Proliferation gewertet. Daneben suchte man durch die Zellzählung und die Mitosezählung Auskunft über die Proliferation von Lymphozyten in Flüssigkulturen zu erhalten. Die Impulscytophotometrie erlangte Bedeutung bei der Bestimmung des Wirkungsangriffs von Wachstumsregulatoren im Zellzyklus. Dabei wird durch spezifische und stöchiometrische Fluorochromierung der Kern-DNA nach Anregung durch kurzwelliges Licht längerwelliges Licht emittiert, dessen Intensität ein Maß für den DNA-Gehalt von Einzelzellen darstellt. Dabei kann aufgrund des unterschiedlichen DNA-Gehaltes die Zugehörigkeit der Zellen zu verschiedenen Phasen des Zellzyklus bestimmt werden und der spezifische Angriffspunkt eines Wachstumsregulators im Zellzyklus erfaßt werden.

All diese Verfahren erlauben nicht, das Proliferationsverhalten der Einzelzelle zu verfolgen, sondern beschreiben lediglich die Änderung des Proliferationsverhaltens der Gesamtheit einer Lymphozytenpopulation als Reaktion auf die Zugabe eines Mediators. Vorteilhaft wäre demnach ein Verfahren, das es erlaubt, das Proliferationsverhalten einer einzelnen Zelle zu verfolgen. ROSENSZAJN (1975) beschrieb erstmals ein Verfahren, das es ihm ermöglichte, die Proliferation von aus Venenblut isolierten Lymphozyten in Agaransätzen zu beobachten. Die Entwicklung von Lymphozytenkolonien ließ sich dabei auf die Proliferation eines

einzelnen stimulierten Lymphozyten zurückführen.
Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung eines standardisierten Verfahrens, das es erlaubt, in kleinen Volumina möglichst gutes Koloniewachstum mitogenstimulierter Lymphozyten unter geeigneten Wachstumsbedingungen zur Austestung der Wirkung von Wachstumsregulatoren auf das Proliferationsverhalten von menschlichen Lymphozyten zu beobachten.

2. Material und Methoden

2.1. Theoretische Grundlagen der Lymphozytenstimulation durch Phytohämagglutinin

2.1.1. Phytohämagglutinin

Phytohämagglutinin (PHA) ist ein heterogenes Gemisch von Glykoproteinen, die aus dem Samen der Gartenbohne (Phaseolus vulgaris) isoliert werden. PHA wurde aufgrund seiner hämagglutinierenden Eigenschaften ursprünglich zur Isolierung von Leukozyten aus Vollblut verwendet, bis NOWELL (1960) das PHA-abhängige Auftreten von Transformation und Mitosen beobachtete und erstmals beschrieb. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, daß PHA reife Lymphozyten aus peripherem Venenblut, Milzgewebe, Thymus und Lymphknoten stimuliert, sich blastenförmig zu transformieren und zu teilen.
Versuche, die lymphozytenstimulierende mitogenetische Aktivität rein darzustellen und von der hämagglutinierenden Aktivität zu trennen, gestalteten sich äußerst schwierig, da sich die Proteinfraktionen des Rohextraktes in ihren physikochemischen Eigenschaften sehr ähnlich erwiesen. ALLEN et. al. (1969) gelang schließlich durch Ionenaustauschchromatographie die Trennung zweier Fraktionen unterschiedlicher mitogenetischer Aktivität. Die Fraktion mit ausschließlich mitogenetischer Aktivität bezeichnete ALLEN als PHA-H, während PHA-L neben der

deutlich geringeren mitogenetischen eine ausgeprägte hämagglutinierende Aktivität besaß. OH und CONRAD (1972) konnten nachweisen, daß PHA ein Tetramer aus zwei Untereinheiten ist. Das von ALLEN beschriebene PHA-H war ein Tetramer aus Untereinheiten mit ausschließlich motogenetischer Aktivität, während das in drei Fraktionen auftrennbare PHA-L aus L_3H-, L_2H_2- und LH_3-Tetrameren bestand.
EDDIE-QUARTEY und GROSS (1978) verglichen die mitogenetische Aktivität von 7 verschiedenen im Handel erhältlichen PHA-Präparationen anhand des Einbaus tritiummarkierten Thymidins (^{3}H-TdR) in stimulierten Lymphozyten. Den höchsten ^{3}H-TdR-Einbau konnten sie bei PHA-purified von WELLCOME (Research Laboratories, Beckenham, England) messen. Diese Präparation besteht aus einer sterilen hochgereinigten Proteinfraktion, die aus dem Samen von Phaseolus vulgaris extrahiert wird und deren Verhältnis von mitogenetischer Aktivität zu der unerwünschten hämagglutinierenden Aktivität durch die Reinigung 100:1 betragen soll. Aus diesen Gründen wurde in vorliegender Arbeit PHA-purified von WELLCOME verwendet.

2.1.2. Interaktion zwischen PHA und Zellwandrezeptor

Obligate Voraussetzung für die Lymphozytenstimulation durch PHA ist, daß das Mitogen an einem Rezeptor auf der Lymphozytenoberfläche gebunden wird. In autoradiographischen Untersuchungen mit tritiummarkiertem PHA war die Zellwand von 95% der Lymphozyten markiert. Wurde innerhalb 1 Std. ein PHA-Antiserum zugegeben, fanden sich die markierten Aggregate nur im Medium und es ließ sich eine vollständige Hemmung des Einbaus von ^{3}H-TdR und ^{3}H-UdR nachweisen. PHA scheint an den o-Glykosyl-Rest eines die ganze Doppelmembran der Zelle durchsetzenden Glykoproteins zu binden (WAGNER 1980). Maximale Transformation fand sich, wenn 20% der Rezeptoren von PHA-Molekülen besetzt waren; wurde PHA im Überschuß zugegeben, nahm die Transformationsrate ab (PERLES

et. al. 1977).
Es ist also zu erwarten, daß es einer optimalen PHA-Konzentration bedarf, um maximale Proliferation zu erhalten.
Hypothesen über den Zusammenhang zwischen der beobachteten Bindung des Stimulators an die Lymphozytenoberfläche und der Aktivierung der Zelle sind jedoch nach wie vor spekulativ.

2.1.3. Metabolische Veränderungen in Lymphozyten nach PHA-Zugabe

Nach KAY (1968) nimmt die Trockenmasse der Zellen innerhalb von 48 - 72 Std. nach PHA-Zugabe um das 2-3 fache zu. Als Indikator einer zunehmenden RNA-Bildung als Zeichen eines gesteigerten Zellmetabolismus zeigt das Zytoplasma stimulierter Lymphozyten zunehmende Basophilie; die Menge zytoplasmatischer RNA (m-RNA, t-RNA, r-RNA) verdoppelt sich innerhalb 1 Std. nach PHA-Zugabe. Im Zellkern war als Zeichen erhöhter Zellaktivität eine zunehmende Euchromatisierung und das Auftreten von Nucleoli zu beobachten. Bei der Bestimmung der Aktivität von Zellenzymen konnte bei 34 Enzymen eine deutliche Aktivitätssteigerung beobachtet werden, darunter auch bei der für die Replikation benötigten DNA-Polymerase, der Polynukleotidligase und den Nukleotidkinasen (LING und KAY 1975a).
Neben einer unspezifischen Zunahme der Permeabilität der Zellmembran und einer gesteigerten Pinozytose spielt ein beschleunigter Membrantransport durch spezifische Trägerproteine eine Rolle (PETERS 1978).
Mehr als 90% der nach PHA-Stimulation blastenförmig transformierten Lymphozyten bildeten mit Schafserythrozyten typische Rosetten, wogegen weniger als 1% Oberflächenimmunglobuline trugen.

Demnach stimuliert PHA unspezifisch T-Lymphozyten. Die Umwandlung von Lymphozyten unter dem Einfluß von PHA stellt das

Modell einer immunologischen Reaktion dar, wie sie in vitro auch durch definierte Antigene hervorgerufen werden kann, wenn die Lymphzyten von einem Spender stammen, der vorher mit dem entsprechenden Antigen sensibilisiert wurde (FISCHER 1977). Daher scheint PHA ein geeigneter Stimulator zu sein, um Lymphozyten in Agar zu Koloniewachstum anzuregen und an diesem Modell die Wirkung von Wachstumsregulatoren auf die Lymphozytenproliferation zu beobachten.

2.2. Versuchsdurchführung

2.2.1. Lymphozytenisolierung

Je 100 ml venöses Blut wurde 10 Spendern mit einer Plastikspritze abgenommen, die mit Na^{+}-Heparinat (Liquemin, Organon Teknika, Oberschleißheim) durchgespritzt wurde. Das heparinisierte venöse Blut wurde vorsichtig mit 100 ml Zellkulturmedium (RPMI 1 640, Flow, Meckenheim bei Bonn) gemischt. 500 ml RPMI 1 640 wurden zuvor 4 ml 5% Glutamin (TC Glutamine 5%, Difco, Detroit) und 5 ml einer Antibiotika-Lösung (TC Penicillin-Streptomycin 10 ml, Penicillin G:100 000 E., Streptomycin: 100 000 ug, Difco, Detroit) zugesetzt. In zehn 50 ml-Zentrifugengläser wurden jeweils 10 ml Lymphoprep (9.6% (w/v) Natrium-Metrizoat und 5.6% (w/v) Ficoll^{R}, Dichte 1.077 g/ml, Nyegaard & Co., Oslo) einpipettiert, mit 20 ml des Blut-Nährmedium-Gemisches überschichtet und 40 Minuten bei 400 g und 20°C zentrifugiert. Dabei bildeten sich zwischen Serum und dem Erythrozytensediment eine Ficoll-Metrizoat-Schicht, die eine weißlichtrübe Bande aus mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) enthielt. Diese wurden mit einer Pasteurpipette abgehebert und nachfolgend 10 Min. lang bei 400 g abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde jeweils in 100 ml DEM (Dulbecco's Mod. Med. (1 x) Gibco Europe, Glasgow mit 4 500 mg/l Glucose ohne Natrium-Pyruvat mit L-Glutamin) aufgenommen und zweimal 10 Min. bei

400 g und 20°C zentrifugiert, um das Lymphoprep auszuwaschen. Anschließend wurde das Sediment in 20 ml DEM aufgenommen, ein Aliquot entnommen und mit Trypanblau gezählt. Außerdem wurde ein Ausstrich angefertigt und nach Pappenheim gefärbt.

2.2.2. Serumgewinnung

Jedem der 10 Spender wurden weiter 50 ml venöses Blut zur Serumgewinnung abgenommen. Dieses wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegeben und nach 2 Std. 15 Min. lang bei 3 000 g zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde dekantiert und erneut 15 Min. lang bei 3 000 g zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde mit Millipore-Filtern(Millex^{R}-GS, Molsheim, Frankreich) sterilfiltriert und in einem sterilen Röhrchen bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 6°C gelagert.

2.2.3. Flüssigkultur

Jeweils 10^{7} mononukleäre Zellen wurden in 6.0 ml DEM-Medium suspendiert; 2.0 ml autologes Serum wurde zugefügt. Den Röhrchen wurden verschiedene PHA-Mengen beigemischt. Die Röhrchen wurden mit Parafilm (Parafilm "M", American Can Company, Greenwich) verschlossen und 18 - 21 Std. bei 37°C inkubiert.

2.2.4. Agaransatz

Die vorinkubierten Zellen wurden 10 Min. lang mit 300 g bei Raumtemperatur abzentrifugiert und zweimal mit 8.0 ml DEM gewaschen. Die Zellen wurden in 1.0 ml DEM aufgenommen, in eine 1 ml-Spritze aufgezogen und durch ein sterilisiertes Zellsieb

gepreßt. Ein Aliquot wurde mit Türk'scher Lösung gezählt und die Zelldichte nachfolgend auf 6 x 10^5/ml eingestellt. 3.4 ml DEM wurde 1.6 ml 3% autoklavierter Noble Agar (Difco Lab., Detroit) zugegeben und im Wasserbad bei 37°C gehalten. Es wurden 600 ul autologes Serum, 500 ul DEM, 500 ul 0.96% Agar, 800 ul Lymphozytensuspension zu 6 x 10^5/ml gemischt. Diesen 2.4 ml-Ansätzen wurden verschiedene PHA-Mengen zugefügt.

Nach gründlichem Durchmischen wurden je 50 ul mit einer Eppendorf-Pipette und autoklavierten Pipettenspitzen in die Vertiefungen von 5 Mikrotestplatten pipettiert (Mikrotest II, Gewebekulturplatte mit 96 ebenen Vertiefungen, Ø 6 mm, Tiefe 10 mm, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg). Von jeder der mit verschiedenen PHA-Konzentrationen versetzten Suspensionen wurden Aliquots von 50 ul in jeweils 10 Vertiefungen von jeder der 5 Mikrotestplatten pipettiert. Jeweils eine Mikrotestplatte wurde in einem Zeissler-Inkubationsgefäß (GasPak, BBL, Becton & Dickinson, USA) bei 37°C in Raumluftatmosphäre unter Zugabe von 5% CO_2 inkubiert. Vom 4. - 8. Tag wurde die Inkubation je einer Mikrotestplatte beendet. In jeder Vertiefung wurden Kolonien und Cluster mit einem Auflichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung gezählt. Zellhaufen von mehr als 5 Zellen wurden als Cluster, bei mehr als 50 Zellen als Kolonien gezählt.

2.2.5. PHA-Mengen

2 mg PHA-purified wurden mit 4.0 ml 0.9% NaCl gelöst, so daß eine Lösungskonzentration von 0.5 mg/ml PHA-purified entsteht. In einem ersten Durchgang wurde den Flüssigkulturen während der 18 - 21 Std. dauernden Inkubation 6 verschiedene PHA-Mengen zugefügt:

	PHA-Zugabe ul	PHA-Konzentration ug/ml
Konz. O:	0	0.00
Konz. A:	6	0.375
Konz. B:	10	0.625
Konz. C:	16	1.0
Konz. D:	24	1.5
Konz. E:	40	2.5

Danach wurde der Agaransatz vorbereitet und den Zellen jeweils 5 ug PHA auf 2.4 ml Zellsuspension zugefügt. Durch Auszählung der im Agaransatz in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wachsenden Kolonien und Cluster als Maß für die Proliferation sollte die optimale PHA-Konzentration für die Flüssigkultur-Inkubation bestimmt werden.

In einem zweiten Ansatz wurden Lymphozyten in der oben beschriebenen Weise mit der im 1. Ansatz herausgefundenen optimalen PHA-Konzentration in Flüssigkultur inkubiert. Danach wurde der Agaransatz vorbereitet. Um die optimale PHA-Konzentration für die Proliferation der Lymphozyten im Agaransatz, gemessen am Auftreten von Clustern und Kolonien, herauszufinden, wurden den Agaransätzen 8 verschiedene PHA-Mengen zugefügt:

	PHA-Zugabe ul	PHA-Konzentration ug/ml
Konz. O:	0	0.00
Konz. 1:	5	1.04
Konz. 2:	10	2.08
Konz. 3:	15	3.125
Konz. 4:	25	5.21
Konz. 5:	40	8.33
Konz. 6:	60	12.50
Konz. 7:	90	18.75

Im 1. wie im 2. Ansatz wurden von jeder Konzentration vom 4. - 8. Tag jeweils die gebildeten Cluster bzw. Kolonien, die der Anzahl der aus 10^4 pro Vertiefung eingesetzten und daraus proliferierten Zellen entsprechen, in 10 Vertiefungen der Mikrotestplatten ausgezählt.

2.2.6. Zellfärbung

Am 6. und 7. Inkubationstag wurden einzelne Kolonien mit einer Pasteur-Pipette aus dem Agar gesaugt, auf einen Objektträger ausgeblasen und ausgestrichen. Danach wurden die Ausstriche an der Luft getrocknet und modifiziert nach Pappenheim gefärbt: 2.5 Min. May-Grünwald-Lösung, 45 Sek. Giemsa-Gebrauchslösung 1:20. Die gefärbten Zellen wurden unter dem Mikroskop morphologisch beurteilt und photographiert.

3. Ergebnisse

3.1. Lymphozytenisolierung

Von Aliquots der über einen Ficoll-Metrizoat-Gradienten isolierten Zellsuspension wurden Ausstriche angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Die isolierten Zellen bestanden zu 96 - 98% aus Lymphozyten, zu 2 - 3% aus Monozyten und zu 0 - 1% aus Granulozyten. Ein weiteres Aliquot wurde mit Trypan-Blau gefärbt. In der Vitalitätsprüfung mit Trypan-Blau waren weniger als 2% der Zellen trypanpositiv.

3.2. Einfluß der PHA-Konzentration in der Flüssigkulturinkubation auf die Proliferation

Die isolierten Lymphozyten wurden in der Flüssigkultur während 18 - 21 Stunden mit 6 Konzentrationen von PHA stimuliert. Abb. 1 gibt die durchschnittliche Cluster- bzw. Kolonienzahl pro 10^4 eingesetzter Zellen aus je 10 Ansätzen von 5 Versuchspersonen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der zugefügten PHA-Menge in der Flüssigkulturinkubation wieder.
Tab. 1 zeigt die über die 5 Versuchspersonen gemittelten absoluten Kolonie- und Clusterzahlen und die zugehörigen Standardabweichungen. Gab man den Lymphozyten in der Vorinkubation kein PHA zu, so bildeten sich trotz Zugabe von PHA im Agaransatz keine Cluster oder Kolonien.
Zur Bestimmung der optimalen PHA-Konzentration in der Flüssigkultur sollten die konzentrationsabhängigen Proliferationsraten miteinander verglichen werden. Für die konzentrationsabhängige Proliferation der Lymphozyten unter PHA-Stimulation kann keine Normalverteilung angenommen werden. Die Mittelwerte der 5 Versuchspersonen und jeder PHA-Konzentration in der Flüssigkultur vom 4. - 8. Inkubationstag wurden daher im Wilcoxon-Test miteinander verglichen. Die Signifikanzniveaus aus dem Vergleich der einzelnen PHA-Konzentrationen gibt Tab. 2 wieder.

3.3. Einfluß der Inkubationszeit auf die Proliferation

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit, gemessen an der größten Proliferationsrate, wurden für jede PHA-Konzentration die an den einzelnen Tagen erreichten Durchschnittswerte aus 10 Parallelkulturen der 5 Versuchspersonen miteinander verglichen. Wie aus Tab. 3 ersichtlich, ergeben sich für die Zählung der Kolonien des 6. gegen den 7. Tag bei allen PHA-Kon-

Tab. 1 Mittelwerte der Clusterzahlen (N_C) und der Koloniezahlen (N_K) mit zugehörigen Standardabweichungen (s_C, s_K) der über die 10 Einzelwerte von 5 Versuchspersonen gemittelten Cluster- bzw. Koloniezahlen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Tag 4 bis Tag 8) und der unterschiedlichen PHA-Konzentrationen in der Flüssigkultur (C_{PHA})

C_{PHA}	Tag	N_C	s_C	N_K	s_C
A	4	95.6	13.3	10.6	6.9
	5	144.1	38.9	17.4	11.0
	6	191.0	19.7	24.4	11.0
	7	187.0	19.3	31.2	14.7
	8	113.0	23.2	22.6	11.5
B	4	124.0	33.7	14.0	9.4
	5	227.8	47.1	19.8	8.9
	6	314.0	60.2	35.0	16.6
	7	226.4	44.8	42.8	23.0
	8	159.4	44.5	28.0	14.2
C	4	224.8	37.8	18.6	12.0
	5	319.6	72.5	36.2	16.1
	6	434.6	69.0	51.6	9.2
	7	331.2	99.6	58.4	7.4
	8	230.6	75.6	41.0	10.0
D	4	154.4	32.6	17.2	8.4
	5	260.6	30.7	32.4	7.7
	6	357.4	22.6	43.6	3.8
	7	254.6	27.9	47.2	5.1
	8	170.4	25.2	34.6	9.4
E	4	157.6	21.6	13.6	8.6
	5	235.8	24.5	30.8	13.8
	6	285.0	43.5	33.2	7.2
	7	198.0	42.6	32.2	9.4
	8	139.8	24.7	24.8	9.5

Tab. 2 Irrtumswahrscheinlichkeiten p ... der U-Tests jeweils zweier Clusterzahlmeßreihen zu unterschiedlichen Konzentrationen (Konz. A bis Konz. E) über die interessierenden Inkubationszeitpunkte (Tag 4 bis Tag 8), in Klammern sind die Irrtumswahrscheinlichkeiten zu den Koloniezahlmeßreihen angegeben (n.s. = p 0.1)

Tag \ C	A/B	B/C	C/D	D/E
4.	0.100 (n.s.)	0.005 (n.s.)	0.010 (n.s.)	n.s. (n.s.)
5.	0.050 (n.s.)	0.050 (0.050)	0.100 (n.s.)	n.s. (0.100)
6.	0.005 (0.100)	0.025 (0.050)	0.025 (0.100)	0.005 (0.025)
7.	n.s. (n.s.)	0.100 (0.010)	0.100 (0.025)	0.025 (0.025)
8.	0.050 (n.s.)	0.050 (0.100)	0.100 (n.s.)	0.050 (0.100)

Tab. 3 Irrtumswahrscheinlichkeiten p ... der U-Tests jeweils zweier Clusterzahlmeßreihen zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten (Tag 4 bis Tag 8) über die interessierenden Konzentrationen C (Konz. A bis Konz. E), in Klammern sind die Irrtumswahrscheinlichkeiten zu den Koloniezahlmeßreihen angegeben (n.s. = p 0.1)

C \ Tag	4/5	5/6	6/7	7/8
A	0.050 (n.s.)	0.025 (n.s.)	n.s. (n.s.)	0.005 (n.s.)
B	0.010 (n.s.)	0.050 (0.100)	0.050 (n.s.)	0.025 (n.s.)
C	0.050 (0.100)	0.025 (0.050)	n.s. (n.s.)	0.100 (0.025)
D	0.005 (0.025)	0.005 (0.010)	0.005 (n.s.)	0.005 (0.010)
E	0.005 (0.100)	0.100 (0.100)	0.010 (n.s.)	0.050 (n.s.)

zentrationen in der Flüssigkultur keine signifikanten Unterschiede, bei den Zählraten der Cluster zeigte sich für den 6. Tag ein signifikantes Maximum.
Zusammenfassend erwies sich für die Vorinkubation eine PHA-Konzentration von 1 ug/ml bei Auswertung der Ergebnisse am 6. Inkubationstag als optimal.

3.4. Einfluß der PHA-Konzentration im Agaransatz auf die Proliferationsrate

Die isolierten Lymphozyten wurden in der Flüssigkultur mit der optimalen PHA-Konzentration von 1 ug/ml stimuliert. Anschließend wurden die Agaransätze vorbereitet und 8 verschiedene PHA-Mengen zugefügt.
Abb. 2 gibt die durchschnittliche Cluster- bzw. Koloniezahl pro 10^4 eingesetzter Zellen aus 10 Parallelkulturen von 5 Versuchspersonen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der zugefügten PHA-Menge im Agaransatz wieder.
Tab. 4 zeigt die über die 5 Versuchspersonen gemittelten absoluten Kolonie- und Clusterzahlen und deren zugehörige Standardabweichungen.

Gab man dem Agaransatz trotz PHA-Stimulation während der Flüssigkultur nicht erneut PHA zu, so konnte kein Wachstum von Kolonien und Clustern beobachtet werden. Auch die Einzelzellen waren nach 4 - 5 Tagen zerfallen.
Zur Bestimmung der optimalen PHA-Konzentration für den Agaransatz sollten die konzentrationsabhängigen Proliferationsraten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit miteinander verglichen werden.
Wie aus Abb. 3 zu entnehmen ist, kann für die von der PHA-Konzentration abhängige Proliferation im Agaransatz keine Normalverteilung angenommen werden, so daß zum Vergleich der Stichproben bei nicht normalverteilten Werten der Wilcoxon-Test

Tab. 4 Mittelwerte der Clusterzahlen (N_C) und der Koloniezahlen (N_K) mit zugehörigen Standardabweichungen (s_C, s_K) der über die 10 Einzelwerte der 5 Versuchspersonen gemittelten Cluster- bzw. Koloniezahlen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Tag 5 bis Tag 8) und der unterschiedlichen PHA-Konzentrationen im Agaransatz (C_{PHA})

C_{PHA}	Tag	N_C	s_C	N_K	s_K
1	5	200.0	39.8	19.0	6.0
	6	256.4	34.5	32.2	9.9
	7	285.2	35.6	38.4	5.0
	8	248.8	25.9	31.4	7.9
2	5	341.2	22.3	37.4	8.1
	6	423.0	31.7	55.0	13.7
	7	397.8	42.2	69.8	11.2
	8	326.6	34.2	59.0	12.3
3	5	368.6	35.6	42.6	8.9
	6	442.2	26.4	63.2	14.1
	7	427.8	45.1	76.6	12.3
	8	349.2	31.2	60.4	11.7
4	5	377.8	54.9	39.4	7.6
	6	470.0	47.8	65.6	15.6
	7	475.4	52.3	83.0	10.9
	8	381.2	51.6	66.6	12.1
5	5	350.6	53.1	29.0	9.2
	6	412.8	48.3	43.2	8.5
	7	427.4	56.7	56.2	13.1
	8	342.0	51.2	49.2	9.2
6	5	252.8	32.2	15.2	11.3
	6	300.2	12.3	30.8	13.2
	7	307.4	52.7	33.8	14.2
	8	255.2	37.3	28.6	8.3
7	5	124.2	6.1	9.2	4.6
	6	167.6	35.1	16.2	9.0
	7	172.2	63.7	17.6	9.4
	8	152.0	57.8	15.2	7.8

verwendet werden muß.
Anhand der Mittelwerte aus jeweils 10 Parallelkulturen der 5 Versuchspersonen wurden die einzelnen PHA-Konzentrationen im Agaransatz an jedem Zähltag (5. - 8. Inkubationstag) miteinander verglichen. Die Signifikanzniveaus aus dem Vergleich der einzelnen PHA Konzentrationen gibt Tab. 5 wieder.
Es ergeben sich für die Proliferation zu Clustern keine signifikanten Unterschiede zwischen Konz. 3, Konz.4 und Konz. 5 im Agaransatz. Bei der Proliferation zu Kolonien ließen sich zwischen Konz. 2, Konz. 3 und Konz. 4 keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Für den optimalen Zählraten an Kolonien ergebenden 7. Tag sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Konz. 3 und Konz. 4 zu beobachten.
Daraus ergibt sich eine optimale Stimulierbarkeit der Lymphozyten, gemessen an der Proliferation zu Clustern und Kolonien für den Bereich zwischen 7.5 ug und 12.5 ug PHA im 2.4 ml-Ansatz.

3.5. Einfluß der Inkubationszeit auf die Proliferationsrate des Agaransatzes

Zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit wurden für jede PHA-Konzentration im Agaransatz die an den einzelnen Tagen über die 5 Versuchspersonen gemittelten Zählraten von Clustern und Kolonien miteinander verglichen und auf ihr Optimum mit dem Wilcoxon-Test untersucht.
Wie aus Tab. 6 ersichtlich, ergeben sich für Proliferation zu Clustern bei allen Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zählraten am 6. und 7. Tag. Hingegen waren die Zählraten für die Proliferation zu Kolonien am 7. Tag signifikant höher. Daraus folgt, daß sich im Agaransatz eine PHA-Konzentration zwischen 7.5 ug und 12.5 ug im 2.4 m.-Ansatz und eine Auszählung am 7. Tag am besten eignet.

Tab. 5 Irrtumswahrscheinlichkeiten p ... der U-Tests jeweils zweier Clusterzahlmeßreichen zu unterschiedlichen Konzentrationen C (Konz. 1 bis Konz. 7) über die interessierenden Inkubationszeitpunkte (Tag 5 bis Tag 8), in Klammern sind die Irrtumswahrscheinlichkeiten zu den Koloniezahlmeßreihen angegeben (n.s. = p 0.1)

Tag \ C	1/2	2/3	3/4	2/4	4/5	5/6	6/7
5.	0.005 (0.005)	n.s. (n.s.)	n.s. (n.s.)	n.s. (n.s.)	n.s. (0.100)	0.010 (0.050)	0.005 (0.050)
6.	0.005 (0.005)	n.s. (n.s.)	n.s. (n.s.)	0.050 (n.s.)	0.100 (0.050)	0.005 (0.050)	0.005 (0.050)
7.	0.005 (0.005)	n.s. (n.s.)	n.s. (n.s.)	0.010 (0.050)	n.s. (0.005)	0.010 (0.050)	0.010 (0.050)
8.	0.010 (0.005)	n.s. (n.s.)	n.s. (n.s.)	0.100 (n.s.)	n.s. (0.050)	0.010 (0.010)	0.025 (0.050)

Tab. 6 Irrtumswahrscheinlichkeiten p ... der U-Tests jeweils zweier Clusterzahlmeßreihen zu unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten (Tag 5 bis Tag 8) über die interessierenden Konzentrationen C (Konz. 2 bis Konz. 5), in Klammern sind die Irrtumswahrscheinlichkeiten zu den Koloniezahlmeßreihen angegeben (n.s. = p 0.1)

C \ Tag	5./6.		6./7.		7./8.	
2	0.050	(0.050)	n.s.	(0.050)	0.025	(n.s.)
3	0.010	(0.025)	n.s.	(n.s.)	0.025	(0.100)
4	0.025	(0.010)	n.s.	(0.050)	0.050	(0.050)
5	0.050	(0.050)	n.s.	(0.050)	0.050	(n.s.)

3.6. Proliferationsrate

Bei 10^4 eingesetzten Zellen im 50 ul-Ansatz ergeben sich bei einer Konzentration von 1 ug/ml PHA in der Flüssigkultur und 3.125 ug/ml (7.5 ug PHA/2.4 ml) im Agaransatz eine Proliferation von 4.3% der Zellen zu Clustern und von o.77% der Zellen zu Kolonien.
Bei einer Konzentration von 5.2 ug/ml (12.5 ug PHA/2.4 ml) im Agaransatz zeigten 4.8% der Zellen Proliferation zu Clustern und 0.83% der Zellen Proliferation zu Kolonien.
Unter den genannten Versuchsbedingungen läßt sich also eine Proliferation von durchschnittlich 4.5% der Zellen zu Clustern und 0.8% der Zellen zu Kolonien erreichen.

3.7. Zellfärbung

Am 6. und 7. Inkubationstag wurden einzelne Kolonien mit einer Pasteurpipette aus dem Agar gesaugt, ausgestrichen und nach Pappenheim gefärbt. Bei der Auswertung ließen sich bei allen Zellen morphologisch Zeichen der Transformation erkennen. Der große, locker strukturierte Kern zeigte prominente Nukleoli, das Plasma war deutlich basophil und zeigte viele Vakuolen (Abb. 4).

3.8. Kolonieentwicklung

Die Beobachtung mikroskopisch wiederauffindbarer markierter Areale zeigte 1 Stunde nach Gießen der Platte vorwiegend Einzelzellen und vereinzelt Aggregate von 3 - 4 Zellen. Nach 3 - 4 Tagen waren diese Aggregate jedoch, ebenso wie die meisten Einzelzellen der Zytolyse anheimgefallen und verschwun-

den. Die Entwicklung von Kolonien aus Einzelzellen über Cluster ließ sich beobachten. Die Kolonien entstanden nicht durch Zusammenfließen mehrerer Cluster, sondern durch mehrfache Teilung stimulierter Einzelzellen. Die Bildung von Kolonien bzw. Clustern stellt daher ein quantitatives Maß der Proliferationsaktivität der Einzelzellen dar.
Nach 7 - 8 Tagen war ein Auseinandertreten der Zellen der Kolonien zu beobachten, die Zellkontakte lösten sich. In den folgenden Tagen konnte man teilweise eine blasige Auftreibung der Zellen und abnehmende Zellzahlen beobachten. Die Zellen degenerierten und fielen der Zytolyse anheim. Eine Vitalitätsprüfung von Zellen aus Kolonien mit Trypan-Blau-Lösung war nicht möglich, da PHA-stimulierte Zellen durch unspezifische Steigerung des Membrantransportes Trypan-Blau aufnehmen. Jedoch hatte die Bildung von Kolonien deren Vitalität bereits bewiesen.

4. Diskussion

Die Möglichkeit, die Proliferation einzelner Lymphozyten zu Kolonien zu beobachten, stellt neben der bis dahin geübten Zellzahlbestimmung, der Bestimmung der Mitoserate, autoradiographischen Untersuchungen, Einbaustudien radioaktiv markierter Metaboliten und der DNA-Gehaltsbestimmung durch die Impulszytophotometrie als Maß für die proliferative Aktivität eine wertvolle Ergänzung dar. Schon COULSON et. al. (1968) versuchten, die charakteristischen morphologischen Veränderungen von PHA-stimulierten Lymphozyten, die in 0.5 - 1% Agar suspendiert und in versiegelten Glaskapillaren kultiviert wurden, zu beobachten. Erstmals gelang es jedoch ROSENSZAJN et. al. (1975) ein Testsystem zu entwickeln, in dem Lymphozyten unter geeigneten Bedingungen Kolonien bildeten, die auf die Proliferation von Einzelzellen zurückgeführt werden konnten. Aus heparinisiertem Venenblut isolierte Lymphozyten wurden 15 - 18 Std. mit PHA-M (Difco) inkubiert. Um im folgenden Agaransatz optimales Koloniewachstum zu erhalten, mußte die Inkubation mit PHA in Flüssigkulturen mindestens 12 Std. betragen. Längere Inkubationszeiten (bis 72 Std.) brachten keine wesentliche Steigerung der Kolonierate.
Ohne diese vorangehende Stimulation konnte ROSENSZAJN kein Koloniewachstum in den folgenden Ansätzen beobachten. Daraufhin inkubierte er Lymphozyten in 15 x 60 mm Petri-Schalen in einem zweischichtigen Agar, dessen untere Schicht aus 5.0 ml 3.3% Agar mit PHA-Zugabe bestand, die obere in 1.7 ml 1.8% Agar 10^6 Lymphozyten enthielt. ROSENSZAJN konnte durch Auszählung im Auflichtmikroskop zwei Typen von Kolonien finden:

1. große Kolonien traten nach 3 - 4 Tagen auf und hatten nach 5 - 6 Tagen 200 - 500 Zellen
2. kleine Kolonien mit 50 - 150 Zellen traten nach 5 - 6 Tagen auf.

Ein ähnliches Verhalten konnte in vorliegender Arbeit beobachtet werden. ROSENSZAJN (1977) nahm an, daß die früher auftreten-

den Kolonien als "feeder-layer" dienen, die die folgende Entwicklung der kleineren Kolonien stimulieren. Andererseits fand er, daß das Auftreten der zwei Kolonietypen von der Tiefe der Kolonien im Agar abhängig sei, wobei sich die kleinen Kolonien auf der Agaroberfläche entwickeln.
Im Gegensatz zu ^{3}H-TdR-Einbaumessungen, bei denen neben PHA auch pokeweed-mitogen (PWM) und Concanavalin A (ConA) die Lymphozyten transformierte und den Einbau von ^{3}H-TdR steigerte, war jedoch nur unter PHA-Stimulation Koloniewachstum im Agaransatz zu beobachten.
Im Gegensatz hierzu konnten FIBACH et. al (1976) auch durch PWM-Stimulation und SREDNI et. al (1976) durch ConA-Stimulation Koloniebildung von Lymphozyten beobachten. Die Proliferationsraten lagen jedoch weit unter den durch PHA induzierten.
Durch cytochemische Untersuchungen, Elektronenmikroskopie und Chromosomenuntersuchungen, durch fehlende Immunfluoreszenz nach Zugabe fluoreszeinmarkierter heterologer Antiimmunglobulinseren und Bildung typischer Rosetten mit Schafserythrozyten fand ROSENSZAJN, daß die die Kolonien bildenden Zellen typische transformierte T-Lymphozyten sind.
ROSENSZAJN hatte somit erstmals ein Verfahren entwickelt, das die Proliferation von Einzelzellen beobachtbar macht. Damit ließ sich die Wirkung von Wachstumsstimulatoren oder Wachstumsinhibitoren auf die Lymphozytenproliferation genauer verfolgen.
FIBACH et. al. (1976) modifizierten ROSENSZAJN's Verfahren. Nach vorhergehender Inkubation von Lymphozyten in Flüssigkulturen mit PHA bzw. PWM, überschichteten sie in einer Petrischale (Ø 35 mm) 2.5 ml 0.5% Agars, der PHA enthielt, mit 0.85 ml 0.33% Agar, der die Lymphozyten enthielt. Im Gegensatz zu ROSENSZAJN verwendeten sie auch im Agaransatz statt fötalem Kalbsserum (FCS) autologes Serum. Wurde nämlich sowohl bei der Flüssigkultur-Inkubation als auch im Agaransatz FCS verwendet, entwickelten sich keine Kolonien. Wurde das autologe Plasma nur im Agaransatz durch FCS ersetzt, so sank die Koloniezahl um 75%. Dies dürfte ein Grund dafür sein, daß sich bei FIBACH 0.1% der eingesetzten Zellen zu Kolonien entwickelten, bei ROSENSZAJN

jedoch nur 0.03 - 0.05%.
Aus diesem Grund wurde auch in vorliegender Arbeit sowohl zur Flüssigkultur-Inkubation als auch im Agaransatz ausschließlich autologes Serum verwendet, da selbst homologes AB-Serum die Kolonierate beträchtlich senkte.

SREDNI et. al (1976) untersuchten den Einfluß der Serumkonzentration im Agaransatz und fanden bei 20% Serum die höchste Koloniezahl. Leider untersuchten sie nur die Konzentrationen zwischen 5 - 20% Serum, so daß der Einfluß noch höherer Serumkonzentrationen auf die Proliferation zu Kolonien ungeklärt blieb. Jedoch scheint der Serumbedarf für optimales Koloniewachstum im Agaransatz höher zu sein als in der Suspensionskultur, die Grundlage des Einbaus radioaktiv markierter Metaboliten als Parameter für die Proliferationsrate ist. COOPERBAND et. al. (1967) fanden bei PHA-stimulierten Lymphozyten einen optimalen ^{14}C-Leucin-Einbau als Maß für die Proteinsynthese bei 5% autologem Serum und einen optimalen $^{32}PO_4$-Einbau als Maß der DNA-Synthese bei 15% autologem Serum. Außerdem konnte bei Verwendung von FCS ein um 15% geringerer ^{14}C-Leucin-Einbau und ein um 35% verringerter $^{32}PO_4$-Einbau gefunden werden.
Die Serumkonzentrationen in vorliegender Arbeit betrugen sowohl in der Flüssigkultur als auch im Agaransatz 25%.

CLAESSON et. al. (1976) untersuchten den Einfluß des PHA in der Flüssigkultur-Inkubation. Sie inkubierten die über einen Ficoll-Isopaque-Gradienten gereinigten Lymphozyten erstmals in einem einschichtigen Agar in Petrischalen (Ø 35 mm). Sie bestimmten die Proliferation am Auftreten von Zellclustern (4 - 50 Zellen) und Kolonien (mehr als 50 Zellen). Sie konnten Beobachtungen von ROSENSZAJN (1975) bestätigen, daß ohne PHA-Zugabe zur Flüssigkultur vor dem Agaransatz kein Koloniewachstum resultierte; lediglich 1% der Zellen bildeten Cluster. Unter vorhergehender PHA-Stimulation bildeten 1 von 150 Lymphozyten eine Kolonie und 5% der Lymphozyten Cluster.
Gleichzeitig fanden sie, daß durch Entfernen der Monozyten von

den durch den Ficoll-Isopaque-Gradienten gewonnenen mononukleären Zellen durch Zugabe von Eisenpulver und darauffolgenden Anlegen eines Magnetfeldes die Anzahl der Kolonien und Cluster im Agaransatz um 80% sanken. Damit übereinstimmend zeigten schon Untersuchungen von LOHRMANN (1974), daß bereits 1% Monozyten in der mit PHA inkubierten Lymphozytensuspension eine deutliche Zunahme des ^{3}H-TdR-Einbaus bewirkten und 10% Monozyten den ^{3}H-TdR-Einbau versiebenfachten. Rätselhaft blieb, weshalb sogar letal bestrahlte Monozyten (5000 rad) die T-Zell-Proliferation so stark stimulierten.

CLAESSON et. al. (1977) nahmen einen stabilen löslichen Faktor an, der von Monozyten gebildet wird, da schon das konditionierte Medium von Monozyten eine deutliche Zunahme des Koloniewachstums bewirkte. Wurden die Monozyten über eine Glassäule entfernt und kein konditioniertes Medium zugesetzt, so fiel das Koloniewachstum um 85%.

Daher scheint die Lymphozytenseparation über den in dieser Arbeit gewählten Ficoll-Metrizoat-Gradienten mit 1 - 2% Monozyten gut geeignet zu sein, optimales Wachstum PHA-stimulierter Lymphozyten zu gewährleisten.

Ziel war jedoch, ein optimiertes standardisiertes Verfahren zu entwickeln, das unter Verwendung kleinster Mengen die Untersuchung der Wirkungsweise von Modulatoren der Lymphozytenproliferation erlaubt, die häufig nur in sehr geringen Mengen verfügbar sind, wie z. B. Chalone.

MAURER et. al. (1977) inkubierten PHA-stimulierte Lymphozyten in Glaskapillaren (Ø 1.38 mm, Länge 125 mm) und fanden optimales Koloniewachstum bei einem Gelvolumen von 50 ul. Nach 7-tägiger Inkubation zählten sie Zellhaufen von 6 - 50 Zellen als Cluster, bei mehr als 50 Zellen als Kolonien. Bei einer Agarkonzentration von 0.18% fanden sie bestes und gleichmäßiges Wachstum. Die Lymphozytenkolonien fanden sich entlang dem Grund des Agargels in einer Flüssigkeitsschicht zwischen Gel und Glaswand. Hieraus schließt MAURER, daß Zellcluster scheinbar zusammenfließen und später dann kompakte Kolonien bilden. Dem entspricht auch die Beschreibung, daß die Kolonien am Gelende rund

seien, in Gelmitte jedoch flach und mit fingerförmigen Ausstülpungen.
Auch CLAESSON (1976) beobachtete bei Agarkonzentrationen unter 0.3%, daß die Zellen im Agar umherschwimmen und ein Zusammenfließen von Clustern zu scheinbaren Kolonien nicht auszuschliessen sei.
Daher scheint die Geometrie der Glaskapillare bei niedrigen Agarkonzentrationen ungeeignet, da der Ursprung einer Kolonie aus einer Einzelzelle wegen des Zusammenfließens von Cluster zu Kolonien am Grund der Glaskapillare nicht mehr gesichert ist. Außerdem fand MAURER in Abhängigkeit von der Gellänge in der Glaskapillare unterschiedliches Wachstum. So entwickelten sich bei einem Gelvolumen von 100 ul in Gelmitte wesentlich weniger Kolonien. Ebenso beobachtete MAURER bei Erhöhung der Agarkonzentration auf 0.3%, daß sich die Kolonien vorwiegend an den Gelenden befinden. Es scheint also, daß sich bei einer Agarkonzentration, die ein Zusammenfließen von Clustern verhindert, im Inkubationsmilieu für Zellen an den Gelenden deutliche Unterschiede zu dem für Zellen in Gelmitte ergeben. Dadurch wird die Bildung von Kolonien in Gelmitte deutlich herabgesetzt.

In vorliegender Arbeit wurden aus peripherem Venenblut Lymphozyten über einen Ficoll-Metrizoat-Gradienten getrennt. Bei der Färbung nach Pappenheim fanden sich 96 - 98% Lymphozyten, 0 - 1% Granulozyten und 2 - 3% Monozyten. Auf eine weitere Reinigung wurde wegen des immer wieder diskutierten proliferationsstimulierenden Einflusses von Monozyten auf Lymphozyten verzichtet. Der Anteil von B-Lymphozyten erweist sich nach Untersuchungen von LOHRMANN et. al. (1974) als wachstumsverbessernd, da unseparierte Lymphozyten nach PHA-Stimulation einen 2.5-fachen ^{3}H-TdR-Einbau gegenüber gereinigten T-Lymphozyten zeigten.
Daher scheint die Lymphozytenseparation über den Dichtegradienten ohne Auftrennung von B- und T-Lymphozyten mit einem Anteil von 2 - 3% Monozyten für Proliferationsstudien an PHA-stimulierten Lymphozyten geeignet zu sein.

Sowohl in der Flüssigkulturinkubation als auch im Agaransatz wurde autologes Serum in einer Konzentration von 25% verwendet, da die Verwendung von FCS oder homologem AB-Serum geringeres Koloniewachstum zur Folge haben.

Es zeigt sich, daß die Zugabe von PHA sowohl in der Flüssigkulturinkubation als auch im Agaransatz unabdingbar ist, da das Fehlen von PHA bei einer der beiden Inkubationen ein Ausbleiben der Proliferation zu Kolonien im Agaransatz zur Folge hat.

Es wurde PHA-purified von WELLCOME als bestgereinigte im Handel erhältliche PHA-Präparation verwendet. Durch Variation der PHA-Konzentration sowohl in der Flüssigkultur als auch im Agaransatz konnten optimale PHA-Konzentrationen herausgefunden werden. Diese betrugen für die Flüssigkulturinkubation 1 ug/ml PHA-purified und im Agaransatz zwischen 3.1 - 5.2 ug/ml.
Für die Flüssigkulturinkubation konnte die durch ^{3}H-TdR-Einbaumessungen gefundene optimale PHA-Konzentration von 1 ug/ml (SIMONS und FOWLER, 1968, EDDIE-QUARTEY et. al., 1978) bestätigt werden. Im Agaransatz müssen jedoch zum Erreichen optimaler Proliferationsraten 3 - 5 ug/ml zugesetzt werden.

In der Flüssigkultur wurden die Lymphozyten ausreichend lang (18 - 21 Std.)mit PHA inkubiert. Die Stimulation der Lymphozyten mit PHA zeigt den unangenehmen Nebeneffekt, daß die Zellen "verkleben" und Aggregate bilden, die eine Zellzahleinstellung vor dem Agaransatz erschweren. Wegen der geringen Leukoagglutination wurden die Zellen nach Waschen mit Medium und unmittelbar vor dem Agaransatz durch ein autoklaviertes Zellsieb gepreßt und PHA der Agarsuspension erst unmittelbar vor dem Einpipettieren in die Mikrotestplatten beigegeben. Wie sich unmittelbar nach dem Festwerden des Agars im Auflichtmikroskop zeigte, lagen wesentlich weniger und kleinere Zellaggregate vor. Beobachtung der Kultur zeigte, daß diese wenigen Zellaggregate nach 3 - 4 Tagen aufgelöst waren und daher zu keiner Verwechslung mit Zellclustern als Folge der Proliferation

von Einzelzellen Anlaß gaben. Die Zählrate von Kolonien und Clustern wurde nicht beeinflußt.

Durch photographische Beobachtungen einzelner wieder auffindbarer mikroskopischer Blickfelder ließ sich das Verschwinden der meisten nicht proliferierenden Einzelzellen innerhalb der ersten 3 - 4 Inkubationstage verfolgen, wogegen sich einige wenige Einzelzellen zunächst zu Clustern (6 - 50 Zellen) und später zu Kolonien (mehr als 50 Zellen) weiterentwickelten. Es zeigte sich, daß auch noch nach 4 - 6 Tagen neue Cluster auftraten. Dies wurde auf lösliche Faktoren zurückgeführt, die von mitogenstimulierten T-Lymphozyten abgegeben werden und sowohl die Proliferation der früh auftretenden Cluster und Kolonien verstärken als auch das Auftreten später Proliferation zu Cluster und Kolonien ermöglichen sollen (lymphocyte colony enhancing factor (LCEF) ZEEVI et. al. 1977)). Dies dürfte auch der Grund dafür sein, daß PHA im Agaransatz kontinuierlich vorhanden sein muß.

In parallel angesetzten Agarkulturen wurden vom 4. - 8. Tag täglich die entstandenen Cluster und Kolonien ausgezählt. Dabei wurden am 7. Tag statistisch signifikant optimale Koloniezählraten und Clusterzählraten gefunden. In den folgenden Tagen traten die Zellen der Kolonien und Cluster zunehmend auseinander, verloren den Zellkontakt und fielen der Zytolyse anheim.

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen ließ sich eine Proliferation von 45‰ der Lymphozyten zu Clustern und von 8‰ der Lymphozyten zu Kolonien beobachten. Bei ROSENSZAJN (1975) entwickelten sich 0.3 - 0.5‰, bei FIBACH et. al. (1976) 1‰, bei CLAESSON (1976) 6.7‰. und bei MAURER (1977) 19‰ der Lymphozyten zu Kolonien.
Sieht man von MAURER's Ergebnissen ab, dessen hohe Koloniezählrate durch das beobachtete Zusammenfließen von Clustern zu Kolonien bedingt sein könnte, so ermöglicht es unsere Technik der Lymphozytenkultivierung in Mikrotestplatten, mit kleinen

Volumina (50 ul) und geringem Materialaufwand selbst geringe Mengen von Wachstumsregulatoren der Lymphozytenproliferation auszutesten und die dabei beobachteten Veränderungen auf Wirkungen an einzelnen Lymphozyten zurückzuführen. Dies stellt eine wertvolle Ergänzung zu den bisherigen Verfahren dar, mit denen die Wirkungen von Regulatoren der Lymphozytenproliferation untersucht werden sollten:

1. Zellzahlbestimmung
Da in Flüssigkulturen die meisten Lymphozyten nach kurzer Zeit durch Autolyse zerstört werden und trotz Zellteilung um so weniger Einzelzellen gefunden werden, je länger die Kultur inkubiert wird, gibt die Zellzahlbestimmung nur geringe Auskunft über die Proliferationskinetik.

2. Mitoserate
Die Mitoserate in Suspensionskulturen beträgt unter Mitogenstimulation ungefähr 1% und liegt damit weit unter der Mitoserate in Agarkulturen.

3. ^{3}H-Thymidin-Einbau
Die Messung des Einbaus radioaktiv markierten Thymidins stellt ein vielgeübtes einfaches und schnelles Verfahren dar. Die meisten bisherigen Untersuchungen nahmen den ^{3}H-TdR-Einbau daher als Parameter der Proliferation. Doch gibt es auch ernstzunehmende Argumente dagegen, den ^{3}H-TdR-Einbau als direktes Maß der Proliferation anzunehmen:

a: In der zu untersuchenden Mediatorsubstanz können sich Proteine befinden, die unspezifisch Thymidin binden; ebenso Enzyme, die das Thymidinmolekül so verändern, daß es nicht mehr im Zellmetabolismus verwendet wird (MAURER und LAERUM, 1975).
b: Die zu untersuchende Modulatorsubstanz könnte die Aktivität der terminalen Desoxynucleotidyltransferase so ändern, daß durch endständige Elongation der primer-DNA das radioaktiv

markierte Nukleotid unspezifisch vermehrt eingebaut würde. So fanden z. B. MASCHLER et. al. (1977) bei der Untersuchung eines Kalbsmilzextraktes eine Hemmung des ^{3}H-TdR-Einbaus, jedoch gleichbleibendes Koloniewachstum. Die ^{3}H-TdR-Einbaumessung ist also allein kein ausreichendes Maß zur Beschreibung der Zellproliferation.

c: Die zu untersuchende Mediatorsubstanz kann selbst unmarkiertes Thymidin enthalten, das mit dem zur Proliferationsmessung beigegebenen zum einen um den Einbau in die Lymphozyten konkurriert und damit den ^{3}H-TdR-Einbau unspezifisch senkt oder durch einen Rückkopplungsmechanismus die Thymidinkinase hemmt (HOUCK et. al. 1976).

4. Autoradiographie

DÖRMER (1973) hat ein autoradiographisches Verfahren beschrieben, durch das die DNA-Syntheserate und die DNA-Synthesezeit einer Zellpopulation bestimmt werden kann. Dieses Verfahren ist jedoch sehr zeitaufwendig und verlangt vom Personal große Erfahrung in der Herstellung und Auswertung von Autoradiographien. Es lassen sich mit Einfachmarkierung, besser noch mit Doppelmarkierungsverfahren (HOELZER, 1978), aus dem Verteilungsmuster markierter Zellen mathematisch die Dauer der Zyklusphasen ableiten. Das Verfahren liefert ähnliche Histogramme und Aussagen wie die wesentlich schneller durchzuführende Impulszytophotometrie (ICP), deren Vorteil in der Messung wesentlich größerer Zellzahlen liegt. Dadurch läßt sich die prozentuale Verteilung von Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen und die nukleäre DNA-Menge genauer bestimmen.

5. Impulszytophotometrie

Die aus der Zytophotometrie weiter entwickelte Durchfluß-Impulszytophotometrie (ICP) (QUEISSER, 1978, GÖHDE et. al., 1971) gibt durch Messung des Gehaltes an Nukleinsäuren im Zellkern jedes einzelnen Lymphozyten die mengenmäßige Verteilung von Zellen mit diploiden, d. h. in G_0- oder in G_1-Phase befindlichen, mit hyperdiploiden, d. h. den in S-Phase befindlichen

und tetraploiden, d. h. in G_2-oder Mitose-Phase befindlichen Zellen wieder. Die ICP zeigt somit, in welcher Zyklusphase ein Inhibitor der Lymphozytenproliferation die Zellen arretiert hat. Voraussetzung ist die spezifische und stöchiometrische Bindung des Fluorochroms an das zu untersuchende Substrat. Am Beispiel des häufig verwendeten Acridinorange zeigt sich jedoch, daß in doppelsträngigen Nukleinsäuren vom helikalen Typ je 3 Basenpaare ein Acridinorangemolekül binden, einsträngige Nukleinsäuren dagegen je Nukleotid ein Acridinorangemolekül - allerdings versucht man durch vorausgehende RNase-Behandlung und einem entsprechenden pH-Wert diese Verfälschung teilweise zu umgehen (ANDREEFF und HAAG, 1975).
Die Affinität des Farbstoffes wird also durch die Tertiärstruktur der DNA beeinflußt. Da jedoch Veränderungen der Konfiguration des Kernchromatins bei der Stimulation der Zelle z. B. durch Hormone, Antigene oder Mitogene angenommen werden, gibt die Messung des kerngebundenen Acridinorange viel mehr den physiologischen Zustand der Zelle als deren tatsächliche Ploidie wieder. Das vermehrte Binden von Acridinorange in PHA-stimulierten Lymphozyten kann demnach sowohl Ausdruck einer veränderten Konfiguration des Kernchromatins sein als auch Zeichen einer Vermehrung des Nukleotidgehaltes des Kerns (SMETS, 1975). Dagegen scheint Ethidiumbromid unter geeigneten Bedingungen konfigurationsabhängig spezifisch und stöchiometrisch an doppelsträngige DNA zu binden (SELA, 1969, LE PECQ, 1971), so daß hierdurch die ICP eine einfache und schnelle Methode zur Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Zelle, des Ploidiemusters wowie der zeitlichen Dauer der Zyklusphasen (BECK, 1978) darstellt. Sowohl der Anteil der S-Phase-Zellen als auch der der Zellen in der G_2-Phase und in der Mitose geben indirekt Auskunft über die proliferative Aktivität der Zellpopulation (BÜCHNER et. al., 1971).

Keines der angegebenen Verfahren kann allein das Proliferationsverhalten von PHA-stimulierten Lymphozyten hinreichend beschreiben. Insbesondere ließ sich die proliferative Aktivität von

Einzelzellen nicht hinreichend bestimmen. Zusammen mit der orientierenden ^{3}H-TdR-Einbaumessung, den Aussagen der ICP über die Dauer der Zellzyklusphasen und die relative Verteilung der Zellen mit diploidem und tetraploidem Kernchromatingehalt erlaubt die Beobachtung und quantitative Auswertung der Prolifertation von Einzelzellen zu Kolonien und Clustern in Agar eine genauere Aussage über das proliferative Verhalten von Lymphozyten.
Aufgrund der hohen Proliferationsrate zu Clustern und Kolonien erlaubt es dieses Verfahren, mit wenig Material (50 ul/Ansatz) und wenigen Lymphozyten (10^{4}/Ansatz)die durch einen zu untersuchenden Wachstumsregulator induzierte Änderung der proliferativen Aktivität unmittelbar am Produkt der Proliferation, dem Auftreten von Clustern und Kolonien abzulesen.

5. Zusammenfassung

Die Kultivierung mit Phytohämagglutinin (PHA unspezifisch stimulierter T-Lymphozyten in Agar und die Auszählung sich bildender Cluster und Kolonien eröffnet die Möglichkeit, ein standardisiertes Verfahren zur Austestung der Wirkung biologischer Wachstumsregulatoren zu entwickeln. Die Vorteile des Mitogens Phytohämagglutinin, seine Wirkung auf zellulärer Ebene und die mitogenetische Aktivität verschiedener PHA-Präparationen werden beschrieben.
Aus Venenblut isolierte Lymphozyten werden nach vorhergehender obligater PHA-Stimulation in Flüssigkultur in Agaransätzen zu je 50 ul in Mikrotestplatten unter erneuter PHA-Zugabe inkubiert und die Proliferation mitogenstimulierter Lymphozyten zu Kolonien (50 Zellen) und Clustern 6-50 Zellen) quantitativ bestimmt. * Zur Optimierung der Kolonie- und Clusterbildungsraten wurde sowohl in der Flüssigkultur als auch im Agaransatz der Einfluß verschiedener Mitogenkonzentrationen überprüft. * Dabei zeigten sich bei Flüssigkulturinkubation von im Dichtegradienten gewonnenen Lymphozyten bei einer PHA-Konzentration von 3.1-5.2 ug/ml PHA * bei 37°C in Raumluftatmosphäre * und Auswertung am 7. Inkubationstag optimale Raten der Kolonie- und Clusterbildung. Unter optimalen Kulturbedingungen wird eine Proliferation von 45% der eingesetzten Zellen zu Clustern und von 8% der eingesetzten Zellen zu Kolonien beobachtet. Die Kolonien lassen sich auf die Proliferation von einzelnen T-Lymphozyten zurückführen, die morphologisch die Kriterien der Transformation zeigen.
Aufgrund der hohen Proliferationsrate zu Clustern und Kolonien erlaubt es dieses Verfahren, mit wenig Material (50 ul/Ansatz) und relativ wenigen Lymphozyten (10^4/Ansatz) die durch einen zu untersuchenden Wachstumsregulator induzierte Änderung der proliferativen Aktivität unmittelbar am Produkt der Proliferation, dem Auftreten von Clustern und Kolonien abzulesen.

Die Vorteile dieses Verfahrens gegenüber anderen Versuchen, die proliferative Aktivität quantitativ zu erfassen, werden diskutiert.

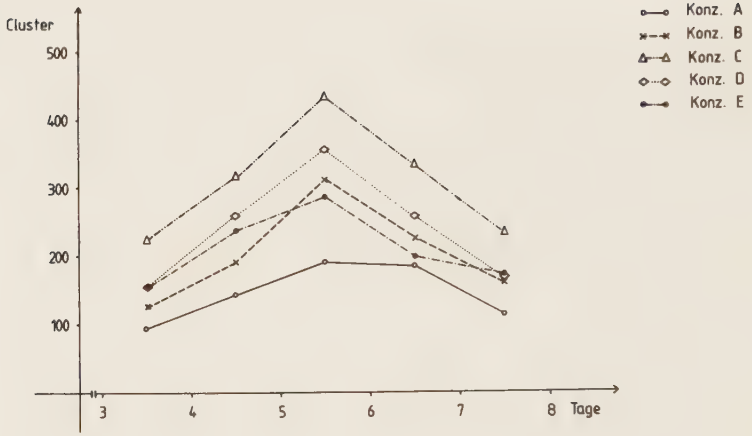

Abb. 1 a Proliferation von Lymphozyten zu Clustern in Agarkultur in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der PHA-Konzentration in der Flüssigkultur

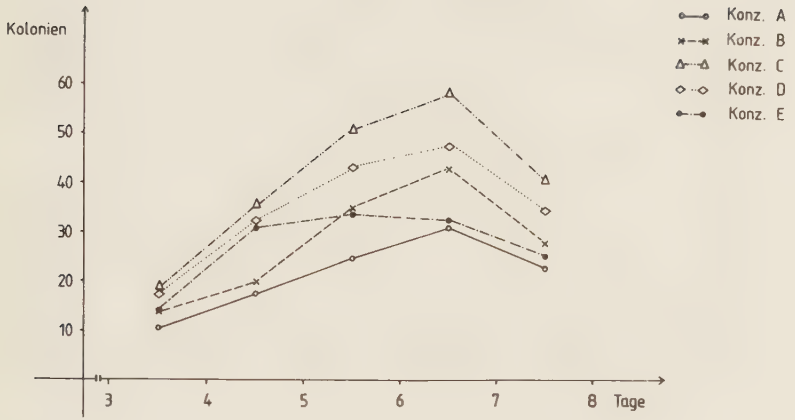

Abb. 1 b Proliferation von Lymphozyten zu Kolonien in Agarkultur in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der PHA-Konzentration in der Flüssigkultur

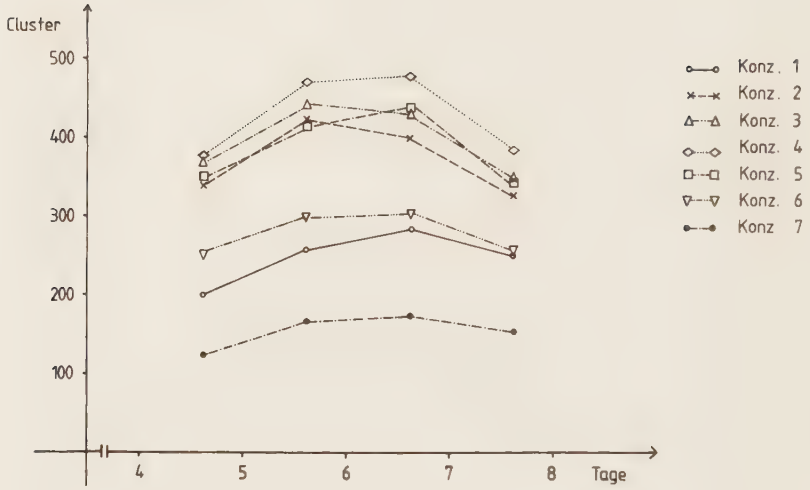

Abb. 2 a Proliferation von Lymphozyten zu Clustern in Agarkulturen zu je 50 ul in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der PHA-Konzentration im Agaransatz

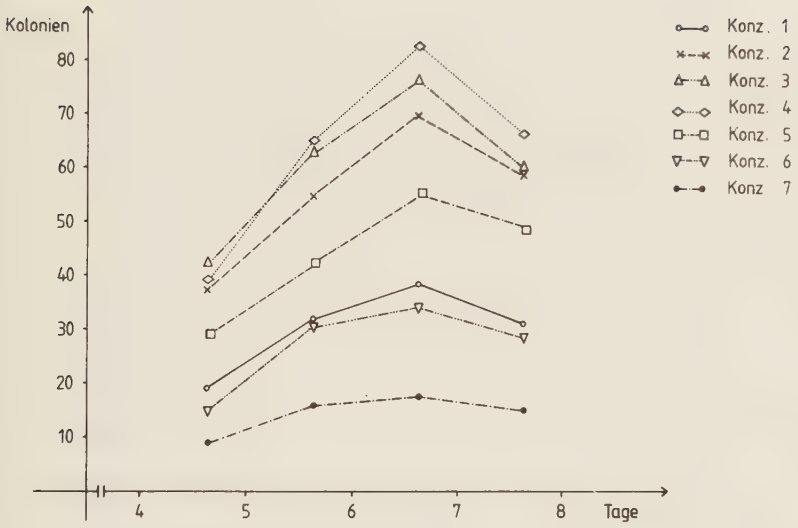

Abb. 2 b Proliferation von Lymphozyten zu Kolonien in Agarkulturen zu je 50 ul in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der PHA-Konzentration im Agaransatz

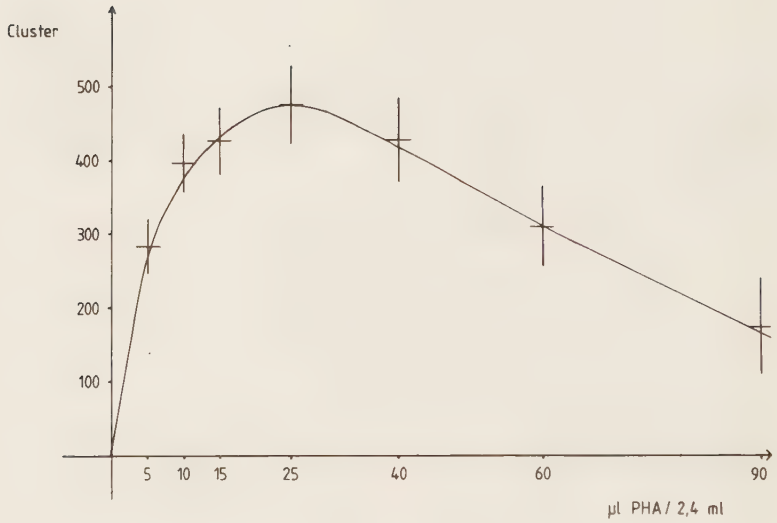

Abb. 3 a Maximale Proliferation von Lymphozyten am Tag optimalen Clusterwachstums in Abhängigkeit von der PHA-Konzentration im Agaransatz

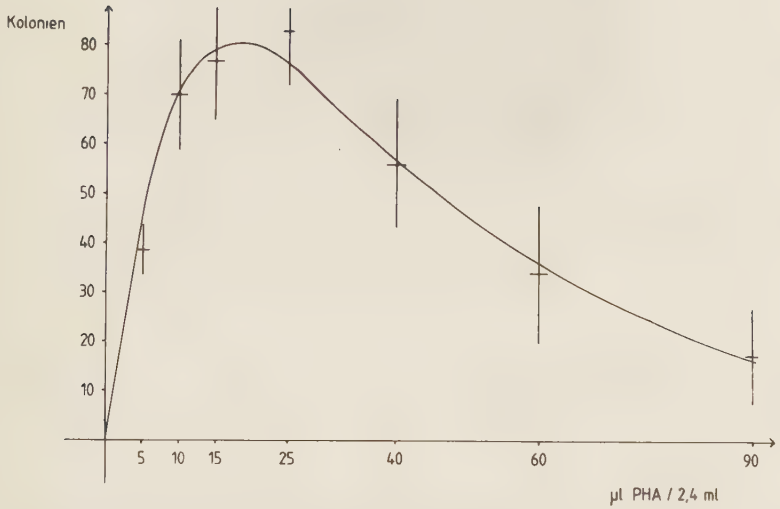

Abb. 3 b Maximale Proliferation von Lymphozyten am Tag optimalen Kolonienwachstums in Abhängigkeit von der PHA-Konzentration im Agaransatz

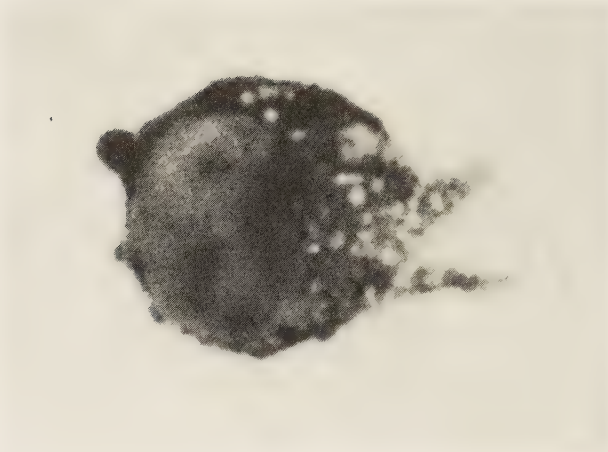

Abb. 4 Lymphozyt aus einer Kolonie mit Zeichen der Transformation

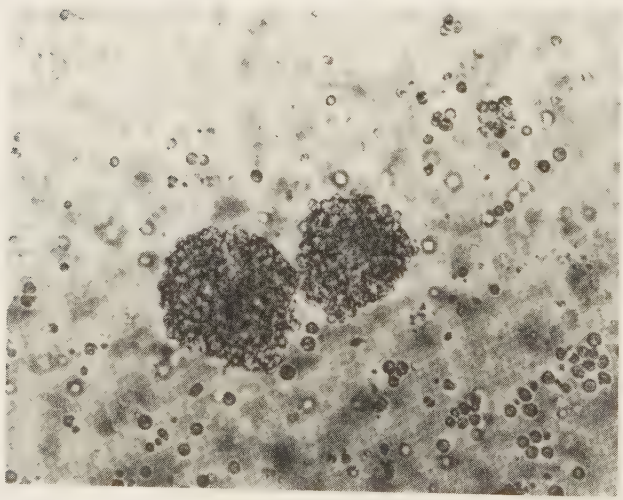

Abb. 5 Lymphozytenkolonien und -cluster nach 7-tägiger Inkubation im Agaransatz

Literaturverzeichnis

ANDREEFF, M., D. HAAG: Fluorochromierung mit Acridinorange in der Impulscytophotometrie. In: ANDREEFF, Impulscytophotometrie, 31 - 37, Springer, Berlin 1975.

ALLEN, W., R. H. SVENSON, S. YACHNIN: Purification of mitogenic proteins derived from phaseolus vulgaris: Isolation of potent and weak phytohemagglutinins possessing mitogenic activity. Proc. N.A.S. 63. 334 - 340 (1969)

BECK, H.-P.: A new analytical method for determining duration of phases,rate of DNA synthesis and degree of synchronization from flow-cytometric data on synchronized cell populations. Cell Tissue Kinet. 11, 139 - 148 (1978)

BÜCHNER, T., W. DITTRICH, W. GÖHDE: Die Impulscytophotometrie in der hämatologischen Cytologie. Klin. Wschr. 49, 1090 - 1092 (1971)

CLAESSON, M. H., M. B. RODGER, G. R. JOHNSON, S. WHITTINGHAM, D. METCALF: Colony formation by human T lymphocytes in agar medium. Clin. exp. immunol. 28, 526 - 534 (1977)

CLAESSON, M. H., S. WHITTINGHAM, M. B. RODGER, A. W. BURGESS: Colony growth of human T lymphocytes in agar: effect of a soluble factor from adherent cells. Eur. J. Immunol. 7, 608 - 612 (1977)

COULSON, A. S., TURK, A., GLADE, P. R., CHESSIN, L. N.: Lymphocyte culture in agar. The Lancet, 89 - 90 (1968)

COOPERBAND S. R., J. A. GREEN, M. A. KENNEDY, M. M. GRANT: Dissociation and Inhibition of the Stimulatory Effect of Phytohaemagglutinin on Protein and DNA Synthesis in Human Lymphocyte Cultures.Nature 214, 1240 - 1241 (1967)

EDDIE-QUARTEY, A. C., N. J. GROSS: Phytohemagglutinin Activation of Lymphocytes: Quantitative Comparison of Different Preparations. A. J. C. P. 69, 326 - 328 (1978)

FIBACH, E., E. GERASSI, L. SACHS: Induction of colony formation in vitro by human lymphocytes. Nature 259, 127 - 128 (1976)

FISCHER, R.: Allgemeine Immunologie und Immunpathologie. In: M. EDER und P. GEDIGK, Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie, 179 - 204, Springer, Berlin(1977)

GÖHDE, W., W. DITTRICH: Impulsfluorometrie - ein neuartiges Durchflußverfahren zur ultraschnellen Mengenbestimmung von Zellinhaltsstoffen. Acta Histochemica X, 429 - 437 (1971)

HAUSEN, P., H. STEIN, H. PETERS: On the Synthesis of RNA in Lymphocytes Stimulated by Phytohemagglutinin: The Activity of Deoxyribonucleoprotein-Bound an Soluble RNA Polymerase. European J. Biochem. 9, 542 - 549 (1969)

HEIDEMANN, E.: Humorale Regulatoren der Zellproliferation in der Hämatopoese: I. Granulopoese und Lymphopoese. Klin. Wochenschr. 58, 1117 - 1133 (1980a)

HEIDEMANN, E.: Humorale Regulatoren der Zellproliferation in der Hämatopoese: II. Erythropoese, Megakaryopoese, pluripotente Stammzelle. Klin. Wochenschr. 58, 1167 - 1174 (1980b)

HERSH, E. M., B. DREWINKO: Specific Inhibition of Lymphocyte Blastogenic Responses to Mitogens by a Factor Produced by Cultured Human Malignant Lymphoma Cells. Cancer Research 34, 215 - 220 (1974)

HOELZER, D.: Zellkinetische Techniken - Autoradiographie. In: W. QUEISSER,Das Knochenmark: Morphologie - Funktion - Diagnostik, 47 - 53, Thieme, Stuttgart(1978)

HOUCK, J. C., V. HUNT: Critique. In: J. C. HOUCK, Chalones, 483 - 491, Elsevier/North Holland, Amsterdam 1976.

KAY, J. E.: Early Effects of Phytohemagglutinin on Lymphocyte RNA Synthesis. European J. Biochem. 4, 225 - 232 (1962)

LE PECQ, J.-B.: Use of Ethidium Bromide for Separation and Determination of Nucleic Acids of Various Conformational Forms and Measurement of Their Associated Enzymes. In: Methods of Biochemical Analysis 20, 41 - 83, (1971)

LING, N. R., E. KAY: Response to stimulation of lymphocyte subpopulations and lymphocytes from various tissues. In: Lymphocyte Stimulation 237 - 252, North Holland Publishing Company, Amsterdam 1975b.

LING, N. R., E. KAY: Metabolic changes during lymphocyte stimulation. In: Lympocyte Stimulation 303 - 347, North Holland Publishing Company, Amsterdam 1975a.

LIPSKY, P. E., J. J. ELLNER, A. S. ROSENTHAL: Phytohemagglutinin-Induced Proliferation of Guinea Pig Thymus-Derived Lymphocytes: I. Accessory Cell Dependence. J. Immunol. 116, No. 3, 868 - 875 (1976)

LOHRMANN, H.-P., L. NOVIKOVS, R. G. GRAW, jr.: Cellular Interactions in the Proliferative Response of Human T and B Lymphocytes to Phytomitogens and Allogeneic Lymphocytes. J. Exp. Med. 139, 1553 - 1567 (1974)

LORD, B. I., K. J. MORI, E. G. WRIGHT, L. G. LAJTHA: Proliferation Regulators in Haemopoietic Cell Populations. Blood Cells 3, 451 - 459 (1977)

MASCHLER, R., H. R. MAURER: A Lymphocyte Chalone Assay Using Lymphocyte Colony Growth in Agar Capillaries. Virchows Arch. B. Cell Path. 25, 345 - 353 (1977)

MAURER, H. R., O. D. LAERUM: Artifacts resulting from the use of (^{3}H)thymidine in chalone test systems. In: Cancer 3, 336 - 339, F. F. BECKER Plenum Press, New York/London (1975)

MAURER, H. R., R. MASCHLER, R. DIETRICH, B. BOEBEL: In Vitro Culture of Lymphocyte Colonies in Agar Capillary Tubes after PHA-Stimulation. J. Immunol. Meth. 18, 353 - 364 (1977)

NOWELL, P. C.: Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. CancerResearch 20, 462 - 466 (1960)

OH, Y. H., R. A. CONRAD: Further Studies on Mitogenic Components of Phaseolus Vulgaris Phytohemagglutinin: Subunit Structure. Arch. Biochem. Biophys. 152, 136 - 137 (1972)

PERLES, B., M. T. FLANAGAN, J. AUGER, M. J. CRUMPTON: Mechanism of lymphocyte activation: the binding of phytohemagglutinin to the lymphocyte surface. Eur. J. Immunol. 7, 613 - 619 (1977)

PETERS, J.H., P. HAUSEN: Effect of Phytohemagglutinin on Lymphocyte Membrane Transport, 2. Stimulation of "Facilitated Diffusion" of 3-O-Methyl-glucose. Eur. J. Biochem. 19, 509 - 513 (1971)

QUEISSER:, W.: Zellkinetische Techniken- Zytophotometrie- In: QUEISSER, Das Knochenmark: Morphologie - Funktion - Diagnostik, 54 - 59, Thieme, Stuttgart(1978)

RESCH, K.: Zytologische Methoden. In: VORLAENDER, Praxis der Immunologie, 123 - 129, Thieme, Stuttgart(1976)

ROSENSZAJN, L. A., D. SHOHAM, I. KALECHMAN: Clonal Proliferation of PHA-stimulated Human Lymphocytes in Soft Agar Culture. Immunology 29, 1041 - 1055 (1975)

SELA, I.: Fluorescence of nucleic acids with ethidium bromide: An indication of the configurative state of nucleic acids. Biochim. Biophys. Acta 190, 216 - 219 (1969)

SIMONS, M. J., R. FOWLER, M. G. FITZGERALD: The Reactivity of Human Small Lymphocytes in Culture: The Effects of Concentration and Duration of Exposure to Phytohemagglutinin. Cell Tissue Kinet. 2, 1 - 9 (1969)

SMETS, L. A.: Impulscytometric Determination of Acridine-Orange Binding by Human Lympocytes. In: ANDREEFF, Impulscytophotometrie, 38 - 41, Springer, Berlin 1975

SREDNI, B., Y. KALECHMAN, H. MICHLIN, L. A. ROZENSZAJN: Development of colonies in vitro of mitogen-stimulated mouse T lymphocytes. Nature 259, 130 - 132 (1976)

TIBBETTS, L. M., P. R. GLADE, P. S. PAPAGEORGIOU: Presence of a Reversible Inhibitor for Human Lymphoid Cell DNA Synthesis in the Extracts of Human Peripheral Lymphocytes. Cell. Immunol. 18, 384 - 395 (1975)

WAGNER, J.: Structure of Membrane Oligosaccharides. In: WAGNER, Introduction to Biologic Membranes, 346 - 359, John Wiley, New York,(1980)

WALDRON, J. A., Jr., R. G. HORN, A. S. ROSENTHAL: Antigen-Induced Proliferation of Guinea Pig Lymphocytes in vitro: Obligatory Role of Macrophages in the Recognition of Antigen by Immune T-Lymphocytes, J. Immunol. 111, 1, 58 - 64 (1973)

ZEEVI, A., I. GOLDMAN, L. A. ROZENSZAJN: Stimulation and Inhibition of Human T-Lymphocyte Colony Cell Proliferation by Hemopoietic Cell Factors. Cell. Immunol. 28, 235 - 247 (1977)

Die vorliegende Arbeit entstand an der Abteilung II der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen (Vorstand: Prof. Dr. H. D. Waller) unter Anleitung von Frau Privatdozentin Dr. E. Heidemann.

Für jegliche Unterstützung möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken. Besonderen Dank schulde ich den technischen Assistentinnen für ihr freundliches Entgegenkommen.

Lebenslauf

Am 20. November 1957 wurde ich, Georg Fuchs, als Sohn des Jakob Fuchs und der Gerda Fuchs, geb. Blokisch in Stuttgart geboren.
Von 1964 - 1967 besuchte ich die Heusteigschule in Stuttgart, von 1967 - 1976 das Karls - Gymnasium in Stuttgart, an dem ich am 20.05.'76 die Reifeprüfung ablegte.
Am 01.10.'76 begann ich das Studium der Medizin an der Eberhard - Karls - Universität Tübingen und legte am 19.10.'82 die Ärztliche Prüfung ab.
Am 25.10.'82 erhielt ich die Approbation als Arzt.
Seit dem 01.11.'82 befinde ich mich in der Weiterbildung zum Arzt für Innere Medizin am Katharinenhospital in Stuttgart.